



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE AGRONOMIA

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ISOLADOS DE *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. EM DIFERENTES
ESPÉCIES DE HORTALIÇAS

MARCOS ANTONIO SARAIVA PIMENTEL

AREIA - PB
JUNHO DE 2016

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ISOLADOS DE *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. EM DIFERENTES
ESPÉCIES DE HORTALIÇAS**

MARCOS ANTONIO SARAIVA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ISOLADOS DE *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. EM DIFERENTES
ESPÉCIES DE HORTALIÇAS**

Trabalho apresentado ao curso de
graduação em Agronomia do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal da Paraíba
em observância às exigências
para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego

**AREIA – PB
JUNHO DE 2016**

MARCOS ANTONIO SARAIVA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ISOLADOS DE *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. EM DIFERENTES
ESPÉCIES DE HORTALIÇAS**

Trabalho de graduação aprovado em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego

CCA/UFPB

Orientador

Msc. Marcelo Pereira Cruz

CCA/UFPB

Examinador

Dra. Priscila Alves Barroso

CCA/UFPB

Examinador

A força suprema do universo que rege todas as suas leis. A minha mãe por nunca permitir que eu desistisse. Aos meus mestres por me conduzirem e despertarem o fascínio por tão excelsa ciência. Aos pioneiros da ciência agronômica.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conduzir de maneira excepcional todas as reações químicas e todos os fenômenos físicos do universo, pois sem a sua sublime intervenção não poderia existir a vida, nem tão pouco os sonhos. Obrigado meu Deus, senhor do universo, aquele que tudo vê e nos consola. Este humilde servo enquanto existir será um exemplo de um milagre realizado por sua glória e compaixão.

Agradeço ao meu pai, Marcos Antonio Pimentel (*in memoriam*), que não poupou esforços para despertar em mim a paixão pela ciência. Obrigado meu mestre por seus livros e esclarecimentos científicos na mesa de jantar. Enquanto eu viver bendirei o seu nome. Agradeço a minha mãe, a professora Rosilda Saraiva Pimentel, que sempre me ensinou a viver e, nunca permitiu que eu desistisse dos meus sonhos. Suas palavras sábias foram cruciais nas horas mais difíceis.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Mailson Monteiro do Rêgo e a professora Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo por me aceitarem no laboratório de biotecnologia vegetal. Duas almas unidas pelo amor e pela ciência, vocês sempre serão para mim exemplos de coragem e determinação. Obrigado por transformarem um sonho em realidade.

Agradeço a todos os meus mestres que ocupam as cátedras do curso de agronomia da UFPB, por despertarem em mim a paixão por tão vasta e nobre ciência. Se não fossem os senhores, o nosso curso não poderia existir. Prometo nunca se esquecer das suas lições.

Agradeço a Dra. Aline da Silva Santos por compartilhar os seus conhecimentos em microbiologia que foram decisivos para a realização deste trabalho. Da mesma forma agradeço ao Msc. Marcelo Pereira Cruz por compartilhar seus conhecimentos em fitotecnia, pois sem eles este trabalho não seria realizado. Agradeço a Dra. Priscila

Alves Barroso, por seus esclarecimentos sobre estatística e Microsoft Office que foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço aos demais colegas do laboratório de biotecnologia vegetal, por me esclarecerem os trâmites científicos e técnicos os quais até então eram obscuros para mim.

Agradeço a minha amiga Elizabeth Bronzeado por incentivar o meu ingresso na escola agrícola Assis Chateaubriand que impulsionou de forma definitiva a minha vontade de cursar o curso de agronomia da UFPB. Continue com seus sonhos libertários e nunca perca a fé na humanidade.

Agradeço a todos os meus companheiros de sala de aula que trilharam comigo o árduo caminho da graduação. Agradeço de forma especial a Denizard Oreska, Josivaldo Ribeiro e Antônio Pereira dos Anjos Neto, sem as suas contribuições esta minha jornada seria muito mais difícil. Agradeço a todos os funcionários do centro de ciências agrárias por tornarem possível a convivência nas suas instalações.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
OBJETIVOS	8
MATERIAL E MÉTODOS	8
Isolamento e identificação de fungo micorrízico	8
Inoculação do fungo micorrízico em raízes das plantas bioindicadoras de patogenicidade.....	9
Caracterização das plantas inoculadas com fungo micorrízico.....	11
Delineamento experimental e análise estatística	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento dos explantes de <i>Epidendrum cinabarinum</i> de aproximadamente 1 cm de comprimento com fungos micorrízicos endofíticos (A) e inoculação dos mesmos em meio BDA (B) em placa de Petri. Barra = 4,5 cm.	9
Figura 2. Inoculação do fungo micorrízico nas raízes das plântulas. Corte a 2 mm do ápice das raízes (A). Inoculação das raízes das plântulas (B). Barra = 4,5 cm.	11
Figura 3. Lavagem das raízes em água corrente (A) Aferição do comprimento das raízes com uma régua graduada.	11
Figura 4. Determinação do diâmetro da folha usando um paquímetro digital (mm).	12
Figura 5. Determinação dos teores de clorofila A, B e total.	12
Figura 6. Aspecto inicial da colônia, branca e cotonosa (A). Aspecto da colônia durante a inoculação das plântulas, bege e feltrosa (B).	13
Figura 7. Colônia envelhecida com esclerócios (marrom) sobrevivendo em um meio de cultura ressecado e pobre em nutrientes.	14
Figura 8. Micrografia ao microscópio óptico evidenciando os núcleos do micélio corado com azul de metileno.	14
Figura 9. Hifas em ângulos de 90°. Disposição das alças de anastomose (a) e constrições (circulo verde) (A). Disposição dos septos (setas brancas) (B).	15
Figura 10. Diferença dos comprimentos e espessuras das raízes do tratamento de 3 horas de inoculação com os outros tratamentos. Fotomicrografia evidenciando as diferenças em espessura das raízes de pepino entre o controle (c) e o tratamento 3 horas de inoculação (esquerda) com 6 horas de inoculação (direita)(B).	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares, lote, germinação, pureza e validade das sementes das plântulas inoculadas com o fungo isolado.....	10
Tabela 2. Análise de variância do efeito do tempo de inoculação do fungo isolado sobre as quatro espécies bioindicadoras relacionado com as dez variáveis biométricas analisadas.....	16
Tabela 3. Comparação das médias da interação entre tratamentos com fungos micorrízicos e o desempenho das quatro espécies bioindicadoras de patogenicidade em relação a variável comprimento de raíz (cm).	17
Tabela 4. Comportamento médio das espécies bioindicadoras de patogenicidade dos fungos micorrízicos inoculados relação as 10 variáveis avalidas no experimento.	17

PIMENTEL, Marcos Antonio Saraiva, Universidade Federal da Paraíba, Junho de 2016.
Avaliação da patogenicidade de fungos micorrízicos isolados de *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. em diferentes espécies de hortaliças. Orientador:
Dr. Mailson Monteiro do Rêgo.

RESUMO

A família Orchidaceae é constituída por cerca de 25.000 espécies distribuídas em 900 gêneros. O gênero *Epidendrum* spp. possui cerca de 1500 espécies e ocorre exclusivamente na região Neotropical, distribuindo-se por uma grande variedade de habitats. Neste trabalho foi isolado um micélio endofítico das raízes de uma orquídea da espécie *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL, e por meio da microscopia óptica apoiada na literatura, identificou-se como sendo do gênero *Rhizoctonia* sp. Após a identificação do isolado, raízes de plântulas susceptíveis a rhizoctoniose (brócolis, couve flor, pepino e repolho) foram inoculadas com o isolado e submetidas a diferentes tempos de exposição ao fungo (3 e 6 horas). Após a inoculação as plântulas foram replantadas em vasos individuais onde permaneceram por 20 dias até a realização da análise biométrica. As variáveis observadas na biometria foram: largura foliar; comprimento da raiz e do hipocótilo; matéria fresca da raiz e do hipocótilo; clorofila A, B e total; matéria seca da raiz e do hipocótilo. Os dados obtidos na biometria foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott ao nível de 1 e 5% de probabilidade. Descartou-se a patogenicidade do fungo isolado, uma vez que não foram observados sintomas de rhizoctoniose nem tão pouco a morte de plântulas; concluímos que todas as plantas bioindicadoras de patogenicidade responderam melhor ao tratamento de 3 horas de inoculação. Um trabalho nesta perspectiva é de suma importância devido à identificação de fungos micorrízicos de orquídeas, que poderá ajudar a superar a difícil fase de aclimação das plântulas as condições *Ex vitro*.

Palavras-chave: Orquídea, *Rhizoctonia*, micorrizas.

PIMENTEL, Marcos Antonio Saraiva, Universidade Federal da Paraíba, Junho de 2016.
Avaliação da patogenicidade de fungos micorrízicos isolados de *Epidendrum cinnabarinum* SALZ EX LINDL. em diferentes espécies de hortaliças. Orientador:
Dr. Mailson Monteiro do Rêgo.

ABSTRACT

The orchid family is made up of about 25,000 species in 900 genres. The genus *Epidendrum* spp. It has about 1500 species and occurs exclusively in the Neotropics, distributing of a wide variety of habitats. In this work we isolated an endophytic mycelium of the roots of an orchid *Epidendrum* species *cinnabarinum* SALZ EX Lindl, and by optical microscopy supported in the literature, it was identified as the genus *Rhizoctonia* sp. After identifying the isolated roots of seedlings which the *Rhizoctonia* (broccoli, cauliflower, cucumber and cabbage) were inoculated with the isolated and subjected to different times of exposure to the fungus (3 and 6 hours). After inoculation the seedlings were planted in individual pots where they remained for 20 days until the completion of biometric analysis. The variables used in biometry were leaf width; root length and hypocotyl; fresh matter of root and hypocotyl; Chlorophyll A, B and the total; dry matter of root and hypocotyl. The data obtained in biometrics were subjected to analysis of variance and means were compared by the Scott Knott test at 1 and 5% probability. Discarded if the pathogenicity of the fungus, since they were not observed *Rhizoctonia* symptoms nor the death of seedlings; We concluded that all bioindicators pathogenicity responded better to the treatment 3 hours of inoculation. A work in this perspective is of paramount importance due to the identification of fungi micorrízicos of orchids, which can help overcome the difficult acclimatization phase seedling conditions Ex vitro.

Key words: Orchid, *Rhizoctonia*, mycorrhizas.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores pertencente às angiospermas, sendo encontrada em todo o mundo, embora o maior número de espécies e de gêneros ocorra nas regiões tropicais. Nestas regiões predominando as formas epífitas e rupícolas, enquanto que fora dos trópicos predominam as formas terrestres (JOLY, 1987). Estão descritas, atualmente, em torno de 25.000 espécies e produzidos outros tantos híbridos por cruzamento de espécies selvagens e cultivadas (STANCATO, BELMANS e VEGRO, 2001).

As orquídeas devido as suas infinitas formas, aromas e nuances de cores, vem conquistando entusiastas de todas as idades e classes sociais a centenas de anos. Ao longo da história, estes entusiastas por esta família botânica criaram associações de colecionadores, onde compartilham suas experiências; promovem exposições e estudam com afinco a sua paixão. É muito corriqueiro um orquidófilo desembolsar uma considerável soma em dinheiro por um espécime *sui generis*. Ficando evidente o quão importante financeiramente é o cultivo das orquídeas.

O cultivo de orquídeas é um negócio que tem se consolidado como importante atividade econômica no Brasil. O setor que movimentou no varejo R\$ 4,0 bilhões em 2010, registrou saldo negativo no comércio internacional. Contudo, sua sustentação continua focada no mercado interno que se encontra longe da saturação. O grande mercado consumidor e produtor é São Paulo, seguido do Rio de Janeiro (REIS, 2011). De acordo com o DIÁRIO DO NORDESTE (2014), a produção comercial de orquídeas no nordeste é muito insipiente, tendo o estado do Ceará boas perspectivas para o negócio, uma vez que se destaca como um grande exportador de flores ornamentais, perdendo apenas para o estado de São Paulo. A indústria brasileira ainda necessita de subsídios científicos para que o país possa atingir cifras econômicas condizentes com a grande diversidade biológica e potencial ornamental representado pela família Orchidaceae no país (PEREIRA e KASUYA, 2010).

A maioria das orquídeas possuem sementes extremamente diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento, destituídas de endosperma. Os embriões constituem-se de pequenos corpos elipsoidais formados por relativamente poucas células que acumulam reservas, predominantemente lipídicas (KRAUS, KERBAUY e MONTEIRO, 2006).

Um dos fatores que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas (SOARES, PASQUAL, *et al.*, 2010).

As orquídeas desenvolveram um distinto relacionamento com fungos micorrízicos. Durante o estágio inicial de desenvolvimento, entre o embrião e a plântula, formam uma estrutura organizada, não fotossintética, com polo apical e basal, destituída de tecido vascular e micoheterotrófica, denominada de protocórmio. Tal estrutura é dependente do simbionte fúngico, o qual possibilita a aquisição de carboidratos, o crescimento e a diferenciação dos tecidos (LINHARES, 2006).

As teorias sobre a especificidade das associações micorríza-orquídea ainda precisam ser exploradas, pois os resultados atuais sobre o assunto são controversos e as orquídeas estudadas, até então estão muito distantes geograficamente e filogeneticamente. Numa perspectiva mais ampla, as orquídeas podem se associar com fungos micorrízicos e estes, por sua vez, podem se associar com outras espécies de orquídeas, tornando a simbiose micorríza-orquídea cada vez mais complexa. Os graus de especificidade relatados entre orquídeas tropicais, autotróficas ou micoheterotróficas, podem variar muito (CUNHA, 2012). No estado de São Paulo, trabalhos com *Hadrolaelia perrini* (Lindl.), espécie epífita de grande interesse comercial, têm demonstrado que inoculações no estágio de plântula promovem a colonização do sistema radicular, independente dos isolados fúngicos utilizados (PEREIRA e KASUYA, 2010).

Os fungos que formam micorrizas em orquídeas são usualmente pertencentes ao filo Basidiomycota; possuem himênio ressupinado, não apresentam conidiogenese na fase assexuada e no estágio anamórfico são classificados como *Rhizoctonia* e gêneros afins. Estes fungos caracterizam-se pela ramificação da hifa em ângulo reto, constrições na região do septo, formação de células monilióides e eventual formação de escleródios. No entanto, há relatos de associações com outros grupos de fungos, como *Armillaria* ssp. *Aphyllophorales* e *Lentinula edodes* (PIMENTEL, 2015).

O gênero *Rhizoctonia* possui alguns representantes fitopatogênicos, que causam sérios prejuízos a muitas culturas agrícolas. O fungo infectando o sistema vascular da plântula, causa o apodrecimento do colo e o consequente tombamento da mesma, sintoma descrito pela literatura como *Damping-off*. Ocasionalmente assim desuniformidade no estande e prejuízo com a reposição das plântulas (BEDENDO, 2011).

O mercado de mudas de orquídeas está numa crescente expansão com desenvolvimento de novos híbridos e incorporação de novos produtores. O principal entrave para a produção está relacionado com a aclimação das mudas cultivadas *in vitro* às condições ambientais externas. Portanto, um trabalho nesta perspectiva é de extrema importância, pela contribuição ao desenvolvimento de novas tecnologias que diminuam as perdas de plantas após saírem das condições *in vitro*.

Diante deste panorama este trabalho tem por objetivo isolar, identificar e inocular em plantas susceptíveis à Rhizoctoniose, um micélio extraído das raízes da espécie de orquídea *Epidendrum cinabarinum* Salzm ex Lindl e comprovar através da biometria e tratamento estatístico a sua patogenicidade, inocuidade ou simbiose. Objetivando futuros sucessos com aclimação de orquídeas, uma vez que o fungo micorrízico irá disponibilizar nutrientes, água e carboidratos as plantas saídas das condições *in vitro*.

REVISÃO DE LITERATURA

A família Orchidaceae é constituída por cerca de 25.000 espécies distribuídas em 900 gêneros. É uma das maiores e mais diversa família de plantas, representando cerca de 7% das angiospermas, e de 10% a 12% das fanerógamas. É cosmopolita, podendo ocorrer em todos os continentes e nos mais variados ambientes, com exceção das regiões cobertas permanentemente por neve, ou dos desertos muito secos. Todas as orquídeas são ervas, em sua maioria epífita e perene. Pelo menos cerca de 30% das orquídeas podem ser terrícolas, rupícolas, palustres e saprofíticas (FORNI-MARTINS, DE MORAES, *et al.*, 2013).

O gênero *Epidendrum* spp. possui cerca de 1500 espécies e ocorre exclusivamente na região Neotropical, distribuindo-se por uma grande variedade de habitats. Populações abundantes, grande número de flores com antese prolongada, ampla distribuição geográfica e fácil cultivo são algumas das características que favorecem o estudo deste gênero (PINHEIRO, 2013).

As espécies de orquídeas apresentam sementes diminutas, desprovidas de tecido de reserva e dependentes da associação com fungos micorrízicos para obter as moléculas simples de carbono e os minerais necessários à germinação e ao desenvolvimento do embrião. Mesmo quando desenvolve metabolismo autotrófico, a associação com o fungo se faz necessária principalmente para obtenção de minerais, tais como fósforo e nitrogênio, sendo possível evidenciar a transferência de carbono da planta para o fungo (PEREIRA, TORRES, *et al.*, 2011). Os fungos micorrízicos de orquídeas apresentam diferentes papéis na natureza. Alguns são conhecidos por serem patógenos importantes na agricultura, outros usualmente formam ectomicorizas ou sobrevivem no solo a partir da degradação de compostos orgânicos (VALADARES, 2009).

A associação micorrízica é uma relação simbiótica entre raízes de plantas e micélios de fungos. A planta hospedeira fornece carboidratos aos fungos associados e, em retorno, recebe deles nutrientes e água. Existem duas classes principais de fungos micorrízicos que são importantes em termos de absorção de nutrientes minerais pelas plantas: micorizas ectotróficas e micorizas arbusculares. (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As ectomicorizas não penetram nas células das raízes, o componente fúngico localiza-se nos espaços intercelulares do córtex radicular, formando uma estrutura

conhecida como rede de Hartig, e se estendem posteriormente formando um manto, que circundam as raízes (GURGEL, 2009). Ao contrário dos fungos micorrízicos ectotróficos, os fungos micorrízicos arbusculares (anteriormente chamados de micorrizas vesículo-arbusculares) não produzem uma manta compacta de micélio fúngico ao redor da raiz. Em vez disso, as hifas crescem em um arranjo menos denso, tanto dentro da própria raiz quanto ao se estenderem para fora da mesma em direção ao solo circundante (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Entre os benefícios que os fungos micorrízicos trazem às culturas, os mais evidentes são o aumento da absorção de nutrientes, sobretudo os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo (P) e o zinco (Zn), entre outros, além de aumentar a resistência das plantas a pragas, doenças e estresses hídricos. Isso acontece porque suas hifas permitem a exploração de um maior volume de solo em comparação à raiz da planta não micorrizada (CARDOSO e NOGUEIRA, 2009).

A associação micorrízica em orquídeas é caracterizada pela formação de uma estrutura fúngica adensada, denominada de *peloton* ou novelo. O contato entre o embrião e o fungo simbiote ocorre via radícula, células suspensoras ou pela infecção direta das células basais do embrião. Uma hifa atravessa a parede da célula vegetal e, a partir deste ponto, ocorre a invaginação da membrana plasmática da célula acompanhada pelo crescimento fúngico, selando a interação (PEREIRA e KASUYA, 2010). Os produtos advindos da digestão enzimática do *peloton* são utilizados pelo embrião para o rompimento do tegumento da semente e, a partir daí, para o surgimento de uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada de protocormo, esta é totalmente dependente de um fungo simbiote para o seu desenvolvimento até torna-se plântula autotrófica (GONÇALVES, NUNES, *et al.*, 2008).

Os principais fungos micorrízicos de orquídeas pertencem ao grupo dos *Rhizoctonia*-like (PESSOA, TEXEIRA, *et al.*, 2012). A forma assexuada (anamórfica) e mais facilmente observada do gênero *Rhizoctonia* é caracterizada por um micélio estéril e incolor, que escurece a medida que amadurece, apresenta hifas largas que formam ramificações em ângulo reto com a hifa principal (MOSQUERA-ESPINOSA, BAYMAN e OTERO, 2010); as hifas são bem desenvolvidas, com septos transversais evidentes (BEDENDO, 2011); apresentam constrições na base das ramificações (CASTRO, 2007) e formam células monilioides (ATALA, PEREIRA, *et al.*, 2015). De

acordo com Boldrini, Santos, *et al.* (2010), as células monilioides se apresentam como cadeias de hifas infladas, intumescidas, em formato arredondado, como um barril.

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito por DeCandole em 1815, sendo *R. solani* a mais conhecida espécie deste gênero por tratar-se de um fungo de ampla distribuição geográfica, de grande importância econômica, fitopatogênico de diversas espécies vegetais. Além de reconhecido fitopatógeno, *Rhizoctonia* é também relatado em associações micorrízicas e endofíticas com orquídeas (PEREIRA, KASUYA, *et al.*, 2005). De acordo com Rezende, Masola JR., *et al.* (2011), o *Rhizoctonia solani* é veiculado pelo solo e causa doenças conhecidas por *damping-off*, este grupo de doenças afeta tecidos vegetais jovens, ainda dependentes ou recém libertados das reservas nutricionais acumuladas na semente. Às vezes esses fungos ocasionam queima de folhagens. Os organismos causadores de *damping-off* não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro, podendo infectar desde espécies herbáceas, como as olerícolas, até lenhosas, como as frutíferas e florestais.

No caso de plântulas emergidas do solo, os sintomas de *damping-off* podem ser observados no caulículo, quase sempre na região do colo. As manchas apresentam-se inicialmente encharcadas, crescem rapidamente, tornam-se escuras e progridem para lesões deprimidas, também de coloração escura, que podem provocar fendilhamento ou constrição do caule. O enfraquecimento do caulículo pode levar ao tombamento da plântula que é, então, colonizada e decomposta pelo fungo. Este quadro sintomatológico é também conhecido por tombamento de mudas, podendo ser frequentemente constatado em locais úmidos e infestado por agentes patogênicos. O ataque do fungo não se restringe obrigatoriamente ao caulículo, sendo comum a presença de raízes escurecidas e em processo de apodrecimento (JR. & KRUGNER, 2011).

Além de uma série de outros microrganismos, *Rhizoctonia solani* é causadora da podridão do colo e/ou raízes das Cucurbitáceas (KUROSAWA, PAVAN & REZENDE, 2005). Maringoni (2005) descreveu a Rhizoctoniose das Crucíferas que acomete plântulas na fase de sementeira, ocasionando os sintomas característicos de *damping-off*. Com o objetivo de certificar sobre a patogenicidade de isolados de fungos extraídos das raízes de orquídeas nativas de Taiwan, Chang (2007), inoculou estes micélios em raízes de plantas susceptíveis de importância econômica na região. As espécies utilizadas pelo autor foram: pepino, feijão chinês e arroz.

O método assimbiótico é frequentemente utilizado na produção comercial de mudas de orquídea. Esse método consiste na incubação das sementes em meios sintéticos contendo uma fonte de carbono simples e solúvel que serve como fonte exógena de energia para a germinação e para o desenvolvimento do embrião (PEREIRA & VALADARES, 2012). A cultura assimbiótica ou semeadura *in vitro* de orquídeas constitui técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiossiontes (UNEMOTO, FARIAS, *et al.*, 2007).

A semeadura de orquídeas *in vitro* torna possível o aproveitamento máximo de sementes, pois quase 100% das sementes germinam. Porém, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização (MORAES, CAVALCANTE e FARIA, 2002). A aclimatização de plantas consiste na retirada das mesmas do cultivo *in vitro* e sua transferência para condições *ex vitro*. A adaptação a esta condição é considerada delicada devido à influência de diversos fatores como: temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes. Além disso, ainda podemos observar que o pH do meio de cultura, dos substratos e dos forófitos também é um fator relevante para a adaptação das espécies (DORNELES e TREVELIN, 2011).

No seu trabalho relacionado com o isolamento e reconhecimento de fungos micorrízicos de orquídeas, Chang (2007) constatou que os fungos micorrízicos aumentam as taxas de sobrevivência de plântulas micropropagadas às condições *ex vitro*; favorece o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo; proporciona floração precoce e de qualidade e diminui as taxas de infecção por patógenos. A inoculação das raízes de orquídeas com *Rhizoctonia ssp.* mostrou que o desenvolvimento de muitas espécies poderia ser reforçado.

A inoculação de fungos micorrízicos pode contribuir para o estabelecimento de uma comunidade microbiana na rizosfera no momento do transplante de um substrato estéril (*in vitro*) para outro não estéril (viveiro ou campo), contribuindo para ultrapassar o conhecido bloqueio de crescimento apical que as plantas micropropagadas sofrem quando transferidas para condições *ex vitro*, devido à falta de fitorreguladores exógenos, que é direta ou indiretamente, equilibrada pela presença de fungos micorrízicos (MARTINS, BAPTISTA, *et al.*, 2005). A introdução do fungo micorrízico na cadeia

produtiva dessas mudas exige mais pesquisas. Isso envolve compreender melhor seu isolamento, sua especificidade na associação com raízes de orquídeas e a possível atuação dos diferentes fungos durante as diferentes etapas do ciclo de vida dessa planta, para assim, elaborar um protocolo de inóculo a nível comercial, que seja eficiente na propagação de orquídeas (PEREIRA e VALADARES, 2012).

OBJETIVO

Avaliar a patogenicidade de fungos micorrízicos isolado das raízes de *Epidendrum cinabarinum* Salzm ex Lindl. em diferentes espécies de hortaliças.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, localizado no município de Areia – PB, no período compreendido entre dezembro de 2015 a março de 2016. O objeto de pesquisa foi uma colônia de fungo isolada das raízes de uma orquídea da espécie *Epidendrum cinabarinum* Salzm ex Lindl, doada por um colecionador do município de Campina Grande – PB (7° 13' 11,07" S e 35° 53' 18,80" O). Este trabalho foi subdividido em três etapas: isolamento e identificação das colônias de fungos das raízes da orquídea; inoculação em plantas bioindicadoras (susceptíveis à cepa patogênica) de Rhizoctoniose e biometria das plantas inoculadas.

Isolamento e identificação de fungo micorrízico

Foram utilizadas raízes jovens de uma orquídea da espécie *Epidendrum cinabarinum* Salzm ex Lindl. No ambiente asséptico da câmara de fluxo contínuo foi realizada a desinfestação das raízes e a inoculação das placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar). A desinfestação foi realizada através da imersão das raízes numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 2%, onde permaneceram por 10

minutos; após esta operação procedeu-se 3 enxagues em água DDA (Água Destilada e Deionizada).

Após a desinfestação as raízes foram secas em papel filtro e seccionadas em fragmentos de 10 mm de comprimento para serem incubadas em placas de Petri contendo meio BDA feito nas seguintes proporções: 1 L de água DDA; 200 g de batata inglesa; 20 g de dextrose e 30 g de ágar (Figura 1). As placas foram vedadas e acondicionadas na sala de crescimento com luminosidade e temperaturas ($26^{\circ}\text{C} \pm 1$) ótimas. O surgimento de micélios de dentro das raízes ocorreu no 2º dia após a inoculação das placas.

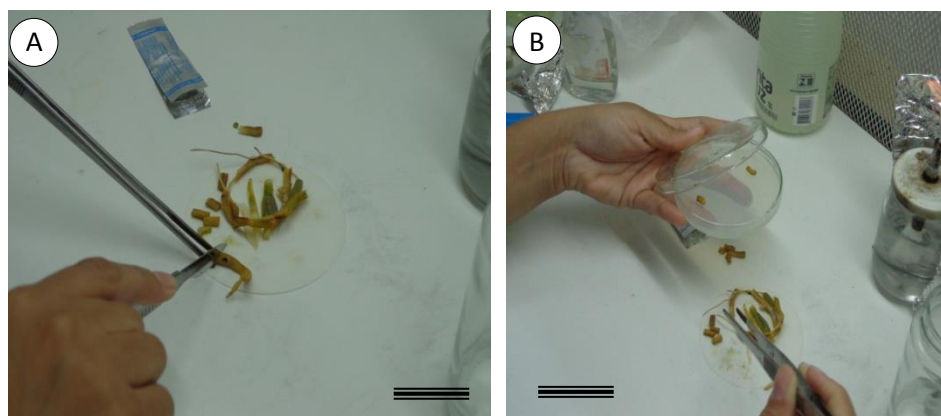


Figura 1 Isolamento dos explantes de *Epidendrum cinabarinum* de aproximadamente 1 cm de comprimento com fungos micorrízicos endofíticos (A) e inoculação dos mesmos em meio BDA (B) em placa de Petri. Barra = 4,5 cm.

Após 7 dias da constatação dos micélios nas placas inoculadas, procedeu-se os exames microscópicos apoiados na microscopia de luz. As lâminas foram feitas com fragmentos de micélios corados com azul de metileno. A literatura e imagens de sites reconhecidos da internet foram as ferramentas que auxiliaram a identificação do fungo micorrízico orquidoide. Após a identificação em nível de gênero, procedeu-se o isolamento da colônia, que foi feito repicando os seus micélios para novas placas com meio BDA.

Inoculação do fungo micorrízico em raízes das plantas bioindicadoras de patogenicidade

As plantas bioindicadoras de patogenicidade à Rhizoctoniose utilizadas neste trabalho foram brócolis (*Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck), couve flor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis* L), pepino (*Cucumis sativus*. L.) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). As sementes utilizadas para a obtenção das plântulas foram da marca comercial Hortivale® (Tabela 1). As sementes foram semeadas numa bandeja de isopor de 200 células preenchidas com o substrato da marca comercial Plantmax®.

Tabela 1 Cultivares, lote, germinação, pureza e validade das sementes das plântulas inoculadas com o fungo isolado.

Cultivar	Lote	Germinação	Pureza	Validade
Pepino caipira	131601	92%	99%	10/2015
Brócolis				
Piracicaba	1912010HV	92%	99%	04/2016
precoce				
Couve flor				
Piracicaba	2814064	82%	99%	09/2016
precoce				
Repolho chato				
de quintal	1414041	92%	99%	07/2016

Após duas semanas da semeadura foi realizada a inoculação das plântulas. Foram realizados três tratamentos: o controle, composto por plantas não inoculadas; as plantas que tiveram suas raízes expostas ao fungo por 3 horas e as plantas que tiveram o tempo de exposição de 6 horas.

As plântulas tiveram as extremidades das raízes cortadas a 2 mm dos seus ápices e foram colocadas em tubos de ensaio contendo 1 cm² do micélio do fungo isolado, foi acrescida uma quantidade de água destilada suficiente para proporcionar o contato das duas estruturas (\pm 30ml) (Figura. 2). Após o término dos tempos pré-estabelecidos de 3 e 6 horas de inoculação, as plântulas foram replantadas em vasos individuais de 900 ml devidamente etiquetados, contendo o substrato da marca comercial Plantmax®.

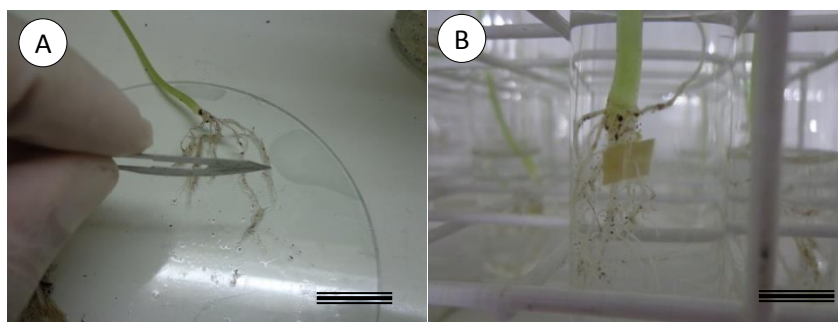


Figura 2 Inoculação do fungo micorrízico nas raízes das plântulas. Corte a 2 mm do ápice das raízes (A). Inoculação das raízes das plântulas (B). Barra = 4,5 cm.

Caracterização das plantas inoculadas com fungo micorrízico

Transcorridos 20 dias da inoculação, foram avaliadas na biometria as seguintes variáveis: largura foliar (LF); comprimento da raiz (CR) e do hipocótilo (CH); clorofila A (CA), B (CB) e total (CT); matéria fresca da raiz (MFR) e do hipocótilo (MFH); matéria seca da raiz (MSR) e do hipocótilo (MSH).

O comprimento da raiz e do hipocótilo foi determinado com o auxílio de uma régua graduada (Figura 3B). As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada de todo o substrato, após esta operação foi realizada a mensuração da região compreendida entre o colo da planta ao ápice da raiz principal (Figura 3A).

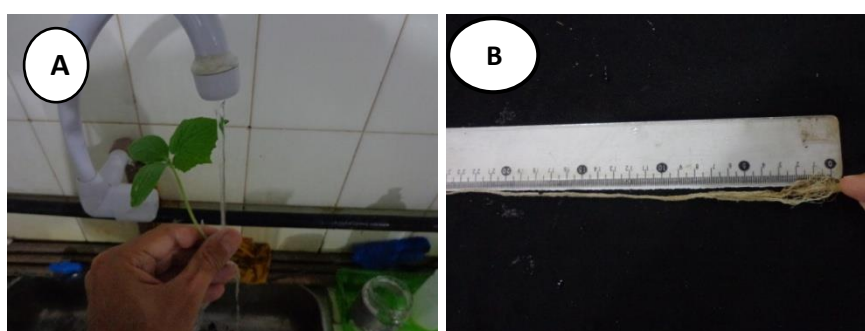


Figura 3 Lavagem das raízes em água corrente (A) Aferição do comprimento das raízes com uma régua graduada.

O comprimento do hipocótilo (CH) foi determinado através da mensuração da região compreendida entre o colo da planta aos primórdios foliares. A largura foliar (LF) foi obtida com o auxílio de paquímetro digital (Figura 4).



Figura 4 Determinação do diâmetro da folha usando um paquímetro digital (mm).

Os teores de clorofila A, B e total foram determinados pelo método não destrutivo, usando um clorofilômetro digital de marca comercial Falker®, modelo CFL1030 (Figura 5).



Figura 5 Determinação dos teores de clorofila A, B e total.

A matéria fresca da raiz (MFR) e do hipocótilo (MFH) foram determinadas pesando-se as duas estruturas separadamente numa balança de precisão digital. Para a determinação da matéria seca, as amostras foram colocadas numa estufa a 40 C° e, periodicamente, aferida as suas massas por meio de balança de precisão digital, o peso das amostras foi estabilizado no quinto dia.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (genótipos x tempos de inoculação), constituindo 12 tratamentos, com 5 repetições cada, totalizando 60 observações. Os dados obtidos foram submetidos a análise de

variância pelo teste F a 5% de probabilidade. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao mesmo nível de significância. As análises foram realizadas usando o programa estatístico genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias de fungos isolados das plantas de orquídeas da espécie *Epidendrum cinabarinum* Salzm ex Lindl logo após, ao surgimento de dentro das raízes, apresentavam um micélio branco e cottonoso (Fig. 6A), que com o passar do tempo, tornou-se bege e feltroso (Fig. 6B). Portanto, corroboramos com Mosquera-Espinosa, Bayman e Otero (2010) quando estes afirmam que a forma assexuada (anamórfica) e mais facilmente observada do gênero *Rhizoctonia* é caracterizada por um micélio estéril e incolor, que escurece a medida que amadurece.

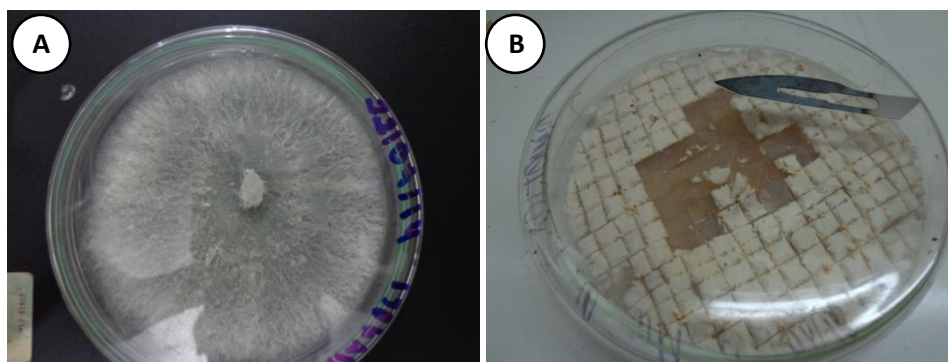


Figura 6 Aspecto inicial da colônia, branca e cottonosa (A). Aspecto da colônia durante a inoculação das plântulas, bege e feltrosa (B).

Observou-se que as colônias velhas que sobreviviam em um meio de cultura ressecado e pobre em nutrientes, produziam uma estrutura de resistência conhecida por esclerócio (Fig. 7). Pereira & Kasuya (2010) relatam que o gênero *Rhizoctonia* sp. eventualmente produzem tais estruturas.



Figura 7 Colônia envelhecida com esclerócios (marrom) sobrevivendo em um meio de cultura ressecado e pobre em nutrientes.

O exame microscópico revelou que o micélio da colônia isolada possuía hifas largas e septadas, multinucleadas (Fig. 8, cabeça da seta), que formavam ângulos de 90° com a hifa principal através de constrictões (Fig. 9A). Foi observado que as hifas formavam anastomose (fusão de hifas) quando em contato com hifas diferentes (Figura 9). Portanto, esses dados são corroborados por aqueles encontrados por MOSQUERA-ESPINOSA, BAYMAN e OTERO (2010), que afirmam que o gênero *Rhizoctonia* forma ramificações em ângulo reto com a hifa principal. BEDENDO (2011), afirma que as hifas são bem desenvolvidas, com septos transversais evidentes, e de acordo com CASTRO (2007), essas constrictões na base das ramificações é característico das rhizoctonias, onde as anastomoses de hifas é uma caracterer útil no processo de caracterização desta espécie (PEREIRA e KASUYA, 2010)

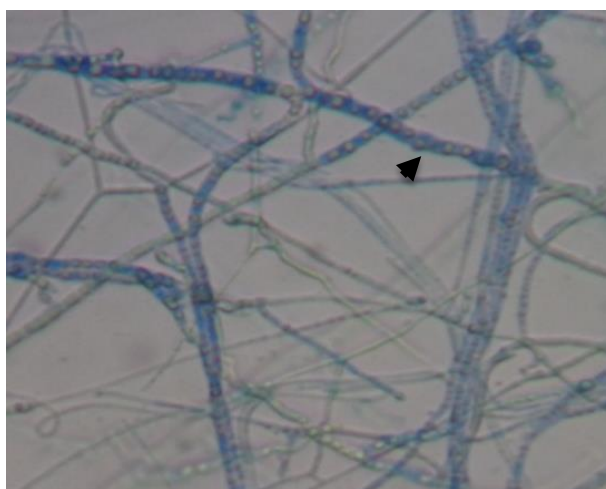


Figura 8 Micrografia ao microscópio óptico evidenciando os núcleos do micélio corado com azul de metileno.

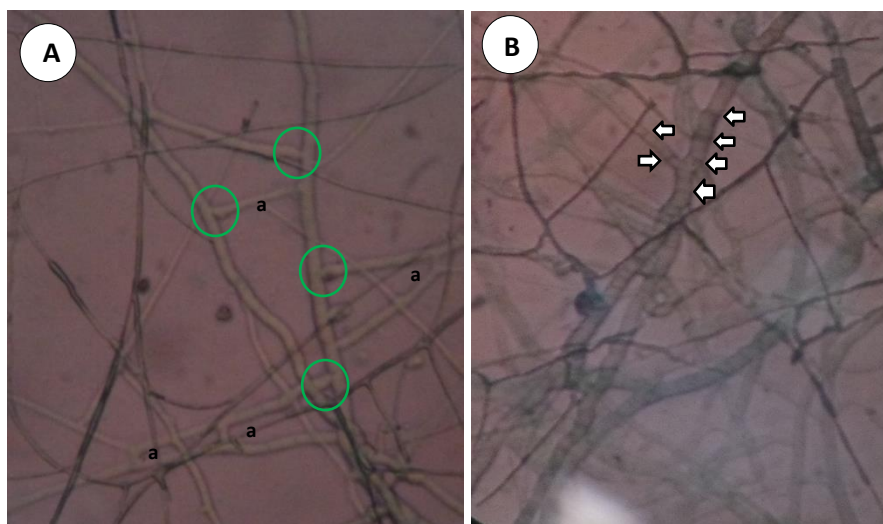


Figura 9 Hifas em ângulos de 90°. Disposição das alças de anastomose (a) e constrições (circulo verde) (A). Disposição dos septos (setas brancas) (B).

Foi observado que todas as espécies inoculadas com o fungo sobreviveram e não apresentaram nenhum sintoma de rhizoctoniose, atestando que a cepa isolada não é patogênica, sendo adequada para inoculação de plântulas micropropagadas. De posse dos dados biométricos foram realizados os tratamentos estatísticos.

Constatou-se por meio da análise de variância que na interação entre os tratamentos, tempos de inoculação com o fungo rhizoctonia, e das quatro espécies de hortaliças bioindicadoras, apenas a variável comprimento de raiz, mostrou diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tab. 2).

Também não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Controle, 3 horas e 6 horas de inoculação) em relação às dez variáveis biométricas analisadas (Tab. 2). Por outro lado, entre as espécies bioindicadoras avaliadas, houve diferenças significativas para todas as variáveis analisadas ao nível de 1% de probabilidade. Este resultado é possivelmente explicado pelas diferenças morfofisiológicas das plantas de brócolis, couve-flor e repolho (brássicas) e pepino (Cucurbitáceas).

Tabela 2 Análise de variância do efeito do tempo de inoculação do fungo *Rhizoctonia* sp. isolado sobre as quatro espécies bioindicadoras .

FV	GL	Quadrados Médios*									
		LF	CR	CPA	MFR	MFA	CA	CB	CT	MSR	MSA
Tratamentos	2	30.54 ^{ns}	0.30 ^{ns}	3.16 ^{ns}	29.86 ^{ns}	0.31 ^{ns}	32.32 ^{ns}	0.00001 ^{ns}	0.00014 ^{ns}	0.00248 ^{ns}	0.00601 ^{ns}
Espécies	3	1213.29 ^{**}	776.73 [*]	129.37 ^{**}	218.28 ^{**}	13.06 ^{**}	335.14 ^{**}	8.81 ^{**}	8.80 ^{**}	10.58 ^{**}	9.83 ^{**}
T x E	6	20,3 ^{ns}	244.29 [*]	1,43 ^{ns}	16.65 ^{ns}	0.51 ^{ns}	22.48 ^{ns}	0 ^{ns}	0.00003 ^{ns}	0.00158 ^{ns}	0.0036 ^{ns}
Resíduo	48	65.02	77.12	4.06	15.41	0,74	20.68	0.00009	0.00006	0.00097	0.00967
Total	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média		21.67	22.98	6.60	20.14	4.99	25.14	1.09	1.11	1.16	1.33
CV%		37.21	38.20	30.55	19.49	17.19	18.09	0.12	0.68	2.68	7.36

ns, não significativo; **, significativo a 1 %; *, significativo a 5%. Legenda: LF, Largura da folha; CR, Comprimento da raiz; CPA, comprimento da parte aérea; MFR, matéria fresca da raiz; MFA, matéria fresca da parte aérea; CA, clorofila A; CB, clorofila B; CT, clorofila total; MSR, matéria seca da raiz; MAS, matéria seca da parte aérea.

Constatou-se através da análise biométrica que as raízes de pepino que foram submetidas ao tempo de inoculação de 3 horas foram superiores em tamanho quando comparado as outras espécies (Figura 10). A comparação das médias da interação entre os tratamentos e as espécies inoculadas em relação ao comprimento das raízes encontra-se na Tabela 3.

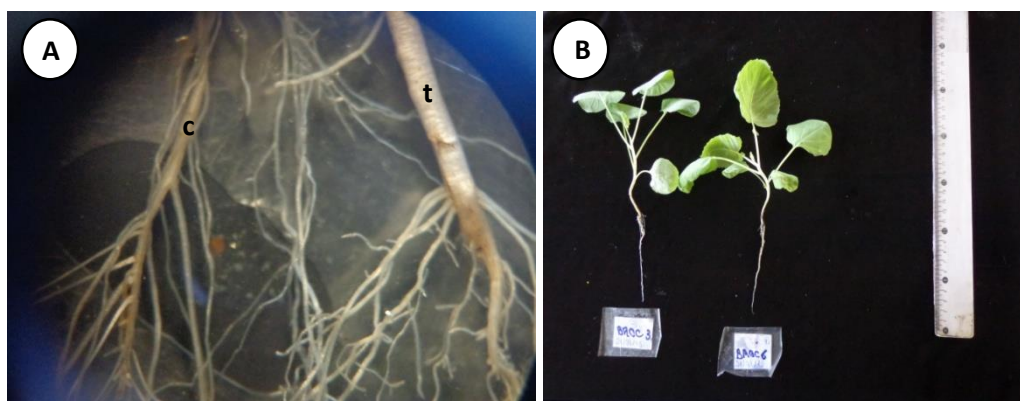


Figura 10 Diferença dos comprimentos e espessuras das raízes do tratamento de 3 horas de inoculação com os outros tratamentos. Fotomicrografia evidenciando as diferenças em espessura das raízes de pepino entre controle (c) e o tratamento 3 horas de inoculação (t) (A). Diferença de comprimento das raízes de brócolis entre os tratamentos de 3 horas de inoculação (esquerda) com o de 6 horas de inoculação (direita) (B).

Ao examinar os dados da Tabela 3, percebe-se um comportamento similar dos genótipos em relação ao controle e o tempo de inoculação de 6 horas, com o potencial fungo micorrízico, ou seja, houve diferenças significativas entre as espécies usadas, exceto, no tempo de 3 horas. Brócolis e pepino apresentaram comportamento similar em relação aos tratamentos controle e 6 horas de inoculação. Além dessas duas espécies, no tratamento 6 horas, a couve-flor também teve comportamento similar. Pepino obteve seu melhor desempenho quando suas raízes foram submetidas a 3 horas de inoculação, quando comparado as outras espécies analisadas neste experimento.

Tabela 3 Comparação das médias da interação entre tratamentos com fungos micorrízicos e o desempenho das quatro espécies bioindicadoras de patogenicidade em relação a variável comprimento de raíz (cm).

Comprimento da Raiz (Cm)				
Tratamento	Brócolis	Couve - Flor	Repolho	Pepino
Controle	15,8400 ^{Ba}	28,7000 ^{Aa}	36,0000 ^{Aa}	11,6000 ^{Bb}
3 horas	15,1400 ^{Aa}	21,5000 ^{Aa}	25,2000 ^{Aa}	30,4600 ^{Aa}
6 horas	15,0000 ^{Ba}	21,6000 ^{Ba}	35,9800 ^{Aa}	18,8000 ^{Bb}

Legenda: ns, não significativo; **, significativo a 1%; * significativo a 5%.

Possivelmente a superioridade do tempo de inoculação de 3 horas sobre o controle e, particularmente, o tempo de 6 horas, seja em função da mudança na relação de simbiose para parasitaria, visto que o aumento no tempo de inoculação é diretamente proporcional ao aumento de estruturas fúngicas nas células corticais das raízes, o que ocasionaria o desequilíbrio do benefício mútuo entre os dois simbiontes.

Quando analisamos as espécies dentro de cada tratamento, verifica-se que não há diferenças estatísticas para as espécies de Brassicaceae. Por outro lado, pepino teve melhor desempenho quando suas raízes foram inoculadas por um período de 3 horas, ou seja, apresentou maior comprimento de raiz quando comparado aos tratamentos controle e 6 horas de inoculação. Corroborando com esses dados, TAIZ e ZEIGER (2013), afirmam que Brassicaceae raramente ou nunca têm micorrizas.

Ao analisar o comportamento médio das espécies bioindicadoras de patogenicidade do fungo isolado das raízes da orquídea, relacionadas com as dez variáveis avaliadas no experimento (Tabela 4), observa-se que, de modo geral, houve um comportamento similar entre Brócolis, couve-flor, repolho e pepino, em relação às variáveis: Largura foliar, comprimento da raiz, comprimento do hipocótilo, clorofila B, clorofila total e matéria seca da raiz. As brassicáceas não diferiram entre si, e o pepino apresentou melhor desempenho em todas estas variáveis analisadas.

As espécies de brássicas obtiveram melhor desempenho em relação à variável matéria fresca (MFH) do hipocótilo, enquanto pepino teve melhor desempenho em relação à matéria seca de hipocótilo (MSH). Dentre as brassicáceas, pior desempenho, foi observado na couve-flor, espécie que menos se destacou, em relação à MSH.

Ao analisar o comportamento do pepino relacionado com as variáveis matérias fresca e seca do hipocótilo, chegou-se ao consenso que o comportamento da espécie em relação à matéria fresca se deve ao fato de um sistema vascular menos constrito do que os das brassicáceas (FILGUEIRA, 2012), influenciando assim a condutividade hidráulica e o armazenamento de água dentro do caule. Portanto, as brassicáceas provavelmente armazenam mais água no hipocótilo do que o pepino.

Com relação a variável matéria seca do hipocótilo, o melhor desempenho do pepino talvez se justifique pelo aporte de carboidratos proporcionado pela associação

Tabela 4 Comportamento médio das espécies bioindicadoras de patogenicidade dos fungos micorrízicos inoculados relação as 10 variáveis avaliadas no experimento.

Espécies Bioindicadoras	Variáveis									
	DF	CR	CH	MFR	M. F. H.	CA	CB	C. T.	M. S. R.	M. S. H.
Brócolis	13,681 ^b	15,327 ^b	5,7867 ^b	25,1353 ^a	6,0433 ^a	31,1780 ^a	0,710 ^b	0,7227 ^b	0,7400 ^b	0,8447 ^c
Couve flor	18,916 ^b	23,933 ^b	5,0933 ^b	20,2620 ^b	5,1667 ^a	25,4487 ^b	0,710 ^b	0,7287 ^b	0,7533 ^b	0,9607 ^b
Pepino	34,575 ^a	32,393 ^a	10,940 ^a	15,9067 ^b	3,7767 ^b	19,6900 ^b	2,241 ^a	2,2613 ^a	2,4247 ^a	2,5467 ^a
Repolho	19,500 ^b	20,287 ^b	4,5733 ^b	19,2647 ^b	4,9960 ^a	26,2607 ^b	0,710 ^b	0,7307 ^b	0,7393 ^b	0,9880 ^b

Legenda: ns, não significativo; **, significativo a 1 %; *, significativo a 5%. DF = Diâmetro foliar; CR = Comprimento da raiz; CH = Comprimento do hipocótilo; M. F. R. = Matéria fresca da raiz; M. F. H. = Matéria fresca do hipocótilo; C. A = Clorofila A; C. B = Clorofila B; C. T. = Clorofila total; M. S. R. = Matéria seca da raiz; M. S. H. = Matéria seca do hipocótilo.

micorrízica. Como sugerido por PEREIRA e KASUYA (2010), as sementes das orquídeas obtêm carboidratos graças a associação com fungos micorrízicos. TAIZ e ZEIGER (2013), afirmam que os carboidratos proporcionam às células em rápido crescimento uma fonte de energia e esqueletos de carbono necessário para a síntese de compostos de carbono. Portanto, a inoculação de plântulas com fungos micorrízicos irá aumentar o peso seco das mesmas devido ao aporte de carboidratos.

Os genótipos também apresentaram comportamento similar quando se avaliou as variáveis, matéria fresca da raiz e clorofila A. O melhor desempenho foi da espécie bioindicadora couve flor.

CONCLUSÕES

O fungo isolado das raízes da orquídea não é patogênico e pertence ao gênero micorrízico (*Rhizoctonia* sp.)

Todas as espécies responderam melhor ao tempo de 3 horas de inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATALA, C. et al. Orchidoid fungi of the form-genus *Rhizoctonia* associated with the roots of *Chloraea cuneata* Lindl. from Araucanía, Chile. **Gayana Botánica**, Concepción, v. 72, jun. 2015. ISSN 0717 - 6643.
- BEDENDO, I. P. Damping off. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. 1, 2011. Cap. 22, p. 435 - 441.
- BOLDRINI, R. F. et al. Bases da associação micorrízica orquídeide. **Natureza on line**, Santa Teresa, p. 140 - 145, 2010. ISSN 1806 - 7409.
- CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. Fungos micorrízicos mantêm sustentabilidade do SPD. **visão agrícola**, Piracicaba, p. 67 - 69, jul | dez 2009.
- CASTRO, C. V. B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn**. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, p. 68. 2007. (589.22).
- CHANG, D. C. N. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In: CHEN, W.-H.; CHEN, H.-H. **ORCHID BIOTECHNOLOGY**. 1ª. ed. Singapura: World Scientific, 2007. Cap. 5, p. 77-98.
- CUNHA, M. F. B. **Associação micorrízica e propagação simbiótica de espécies de *Hadrolaelia* & *Hoffmannseggella* (Orchidaceae)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa , p. 80. 2012.
- DIÁRIO DO NORDESTE. **Diário do Nordeste**, 23 nov. 2014. Disponível em: <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/negocios/flores-ganham-espaco-no-mercado-externo-1.1157364>>. Acesso em: 26 mar. 2016.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação in vitro. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v. 66, p. 167-174, Dezenbro 2011.
- FORNI-MARTINS, E. R. et al. **EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ORCHIDACEAE**. 30º ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO. Piracicaba: ESALQ/LGN. 2013. p. 25-31.

GONÇALVES, J. F. et al. **Isolamento de fungos micorrízicos de *Cyrtopodium verum*, orquídea terrestre de campos rupestres do estado de Goiás**. UFG. Samambaia, p. 5. 2008.

GURGEL, F. E. **Fungos ectomicorrízicos em áreas de mata atlântica do nordeste do Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, p. 66. 2009.

JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à taxonomia vegetal**. 8. ed. São paulo: Nacional, 1987.

JR., N. S. M.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia**. 4^a. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. I, 2011. Cap. 8, p. 149-206.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. in vitro: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, p. 177-184, 2006. ISSN 2236-8906.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H., et al. **Manual de fitopatologia**. 4^a. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. II, 2005. Cap. 32, p. 293-307.

LINHARES, D. O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do parque estadual da serra do brigadeiro (MG)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 36. 2006.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H., et al. **Manual de fitopatologia**. 4^a. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. II, 2005. Cap. 31, p. 285-291.

MARTINS, A. et al. Estudos e perspectivas futuras das micorrizas e da indução de micorrização in vitro e ex vitro de *Castanea sativa* Mill. **A pantorra**, Macedo do Peso, v. 5, p. 59-78, 2005.

MORAES, L. M. D.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (ORCHIDACEAE) Propagadas in vitro. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 1397-1400, 2002.

MOSQUERA-ESPINOSA, A. T.; BAYMAN, P.; OTERO, T. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. **Acta agronómica**, Palmira, v. 59, jul. 2010. ISSN 2323 - 0118.

PEREIRA, M. C. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, Julho 2011. ISSN 0102-3306.

PEREIRA, M. C.; VALADARES, R. B. D. S. DIVERSIDADE E APLICAÇÃO DOS FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS. In: PAZZA, R., et al. **BIODIVERSIDADE EM FOCO**. 1ª. ed. Rio Paranaíba: Araucária Comunicação Integrada, 2012. Cap. 12, p. 69-81.

PEREIRA, O. L. et al. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, viçosa, v. 29, may / abril 2005. ISSN 1806-9657.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Micorrizas em orquídeas. In: SIQUEIRA, J. O., et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. Cap. 20, p. 583 - 605.

PESSOA, H. P. et al. Caracterização micorrízica de *Oeceoclades maculata* (LINDL) LINDL. e utilização de seus simbiontes fúngicos na germinação e produção de mudas de orquídeas nativas da região do alto Paranaíba - MG. **Evolução e conservação da biodiversidade**, Rio Paranaíba, v. 3, p. 6 - 13, jan. 2012. ISSN 2236 - 3866.

PIMENTEL, M. A. S. **Isolamento de fungo rhizoctonioide de raízes de orquídea e inoculação em raízes de espécies susceptíveis para verificar sua patogenicidade**. Universidade Federal da Paraíba. Areia, p. 22. 2015.

PINHEIRO, F. **QUANDO A FILOGEOGRAFIA SE ENCONTRA COM A ESPECIAÇÃO: ELEVADA ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E DEPRESSÃO POR ALOGAMIA REVELAM OS ESTÁGIOS INICIAIS DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO EM UMA ESPÉCIE DE ORQUÍDEA NEOTROPICAL**. 30º ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO. Piracicaba: ESALQ/LGN. 2013. p. 12-17.

REIS, J. N. P. **IX encontro da sociedade brasileira de economia ecológica**. CULTIVO DE ORQUÍDEAS: UMA OPÇÃO À AGRICULTURA FAMILIAR? Brasília : [s.n.]. 2011.

REZENDE, J. A. M. et al. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia**. 4ª. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. I, 2011. Cap. 3, p. 37-58.

SOARES, J. D. R. et al. Estiolamento e luz artificial no cultivo in vitro de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2010. ISSN 0103-8478.

STANCATO, G. C.; BELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista brasileira de horticultra ornamental**, Campinas, v. 7, p. 25 - 33, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

UNEMOTO, L. K. et al. PROPAGAÇÃO IN VITRO DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS EM MEIO DE CULTURA SIMPLIFICADO. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, p. 267-269, Abril-Junho 2007.

VALADARES, R. B. D. S. Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidacea) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae. Piracicaba - SP. 2009.